气相色谱法对狂犬病疫苗灭活工艺中β-丙内酯研究

高彦 杜晶晶 王斌 刘琦 申志强*
（华兰生物工程股份有限公司 研发中心 新乡 453000）

摘要 目的：基于 GC-FID 法，对狂犬病疫苗生产过程中采用的β-丙内酯灭活剂进行了含量及稳定性研究。方法：气相色谱条件：采用 Agilent DB-624（30 m×0.530 mm×3.00 μm）毛细管柱；升温程序：初始温度为 80 ℃，保持 1 min，以 20 ℃/min 的速率升温至 200 ℃，保持 3 min；色谱柱流量：3 mL/min；检测器温度：250 ℃；进样口温度：150 ℃；载气：氮气，线速度：25 cm/sec；进样量：1 μL，分流比为 2:1，进样方式：手动进样。结果：以乙腈作为稀释剂，BPL 在 1:100～1:32000 范围内线性关系良好（R^2≥0.999）。在 1:200、1:1000、1:8000 三个浓度水平下，加标回收率在 95.04%～116.86%之间，相对标准偏差（RSD）为 2.6%～3.2%，检测限为 0.112 μg/mL。结论：该方法简便、专属性强、稳定且在室温条件下操作，大大降低了对试验条件和技术操作的要求，能够满足灭活狂犬病病毒工艺中对 BPL 检测的需求。

关键词 狂犬病疫苗 β-丙内酯 气相色谱

狂犬病是一种由狂犬病病毒（Rabies Virus）引起的人兽共患病[1]。狂犬病病毒主要通过破损的皮肤或黏膜侵入人体，其最大特点之一，就是具有高度的嗜神经性。一旦发病，死亡率几乎达 100%。全球范围内每年因狂犬病导致的死亡超过 55000 例，我国位居全球第二[2,3]。鉴于我国是狂犬病高发国家，每年用于狂犬病防疫的费用超过 100 亿元，注射狂犬病毒疫苗的数量达到 1200～1500 万支，使得我国成为全世界狂犬疫苗消费的最大市场。

根据相关指导原则要求[4-6]，为提高生物制品的安全性，在制品生产工艺中要具有一定的去除/灭活部分病毒方法。在灭活疫苗制备技术中，常用的病毒灭活剂包括甲醛、福尔马林与β-丙内酯（β- propiolactone，BPL）。其中，β-丙内酯（β-propiolactone, BPL）又称 3-羟基丙酸内酯，是目前国内预防狂犬病的人用狂犬病纯化疫苗的优良灭活试剂。因不直接作用于蛋白质，主要通过与核酸分子中

收稿日期：2018-10-25 修回日期：2018-12-27
*通讯作者：申志强，电子邮箱：szq3219@hualan.com

的嘌呤碱基反应破坏核酸的结构来达到灭活目的，因此能使灭活的病毒保持良好的免疫原性[7,8]。目前，有关 BPL 的检测方法有液相色谱法[9,10]、气相色谱法[11-15]。由于 BPL 紫外吸收较弱，所以致使 HPLC-UV 法的应用受到一定的限制。相比之下，气相色谱法虽然具有较多优势，但在前处理过程中大多采用水溶液制备 BPL 对照品溶液，而据有关资料显示[16]，BPL 在水溶液中极不稳定，易水解，从而为实现β-丙内酯的准确测定带来困难。水解方程式如下所示：

H_2O

β-丙内酯　　　　3-羟基丙酸

图 1　β-丙内酯水解图

Figure 1　β-propiolactone hydrolysis diagram

本文采用乙腈作为对照品溶液的溶剂，建立了人用狂犬病毒浓缩液中 BPL 含量检测方法。该方法在室温条件下进行操作，大大降低了对试验条件和操作技术的要求。此外，本文还通过模拟病毒工艺中 BPL 的使用操作，绘制了 BPL 添加到病毒中间体之前的降解曲线，从而为确定 BPL 在病毒灭活工艺中适宜的工作浓度及添加时限提供数据参考。

1　材料与方法

1.1　主要仪器设备

气相色谱仪：配有氢火焰离子化检测器（型号：Agilent 7890B）；电子天平（型号：常熟市双杰 JJ1000）；涡旋混匀器（型号：SilentShake HYQ-2121A）；Agilent DB-624 毛细管柱（规格：30 m×0.530 mm×3.00 μm）。

1.2　试剂与标准品

乙腈（色谱级）购自德国 Merck 公司；无水磷酸二氢钠（分析级）、无水磷酸氢二钠（分析级）均购自上海实验试剂有限公司；氯化钠（分析级）购自天津科密欧化学试剂有限公司；BPL 标准品购自德国 Serva 公司（含量：1.123 g/mL）；供试品 A 由本公司自制（批号:20180723）

1.3　气相色谱条件

初始温度：80 ℃，保持 1 min，之后，以 20 ℃/min 的速率升温至 200 ℃，保持 3 min；色谱柱流量：3 mL/min；检测器温度：250 ℃；进样口温度：150 ℃；载气：氮气，线速度：25 cm/sec；进样量：1 μL，分流比为 2:1，进样方式：手动进样。

1.4 溶液配制

1.4.1 标准品处理

1.4.1.1 BPL 标准储备液

精密移取 100 μL BPL 于离心管中，向其中加入 900 μL 乙腈，混匀，即得 BPL 标准储备液（稀释比例：1:10），并于 2～8℃冰箱中保存。

1.4.1.2 BPL 标准工作液

精密移取一定量上述 BPL 标准储备液，用乙腈将其梯度稀释为 1:100、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 一系列标准溶液，并于 2～8℃冰箱中保存，备用。

1.4.2 磷酸盐缓冲溶液（pH=7.6）

精密称取 0.3119 g 磷酸二氢钠、2.4701 g 磷酸氢二钠、8.1816 g NaCl 于烧杯中，加适量超纯水充分溶解后定容至 1 L。最后，用 NaOH 或 HCl 调节 pH=7.6，待用。

1.5 实验方法

1.5.1 乙腈最佳添加量确定

因 BPL 在水溶液中极不稳定，所以以 PBS:乙腈=1:1 为稀释起点，结合实际情况，稀释比例最终设为：1:1、1:10、1:20、1:40、1:80，每个梯度平行测定 2 次。之后，加入一定量的 BPL 标准储备液，混匀后即得不同比例乙腈处理下的 BPL 水溶性样品，最后立即经气相色谱上机测定。通过对比观察各梯度下的响应值，以确定乙腈的最佳添加量。

1.5.2 方法学评价

1.5.2.1 专属性

溶剂乙腈作为溶液 a，用乙腈配制的 1:2000 的 BPL 标准液作为溶液 b，含已知浓度 BPL 的样品溶液作为溶液 c，分别进行上机检测，以确定其保留时间和分

离度，分离度应大于 1.5。

1.5.2.2　线性关系

取实验 1.4.1 配制的 1:100、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000 的一系列 BPL 标准溶液，在 1.3 所示的色谱条件下进行上机检测。以峰面积（A）为纵坐标，质量浓度（C，mg/mL）为横坐标绘制标准工作曲线，计算出对应的线性回归方程及相关系数，要求相关系数（R^2）不小于 0.99。

1.5.2.3 检出限和定量限

精密量取一定量的 1:32000 的 BPL 标准溶液逐步稀释并分别进样，调整检测灵敏度，按照信噪比为 3：1 确定 BPL 的检测限，按照信噪比为 10:1 确定 BPL 的定量限。

1.5.2.4　准确度

以已知 BPL 浓度的样品为研究对象，在 1:200、1:1000、1:8000 三个不同浓度水平下进行加标回收实验，每个添加水平平行测定 3 次（n=3）。计算各浓度水平下的加标回收率，要求回收率在 80%～120%之间。

1.5.2.5　精密度

配制 1:2000 的 BPL 标准溶液重复进样 6 次（n=6），计算此条件下峰面积和保留时间的相对标准偏差（RSD），要求 RSD≤3%。

1.5.2.6　耐用性

室温条件下，取 1:4000 的 BPL 标准溶液分别在 0 min、40 min、120 min、180 min、240 min 及 360 min 进行上机检测，考察 BPL 在乙腈溶液中的稳定性。

1.5.3　2～8℃时，BPL 原倍和在稀释液中降解速度考察。

取 2～8℃下的供试品 A 和 BPL 纯品在 1.3 所示的色谱条件下分别于 0 min、15 min、30 min、60 min、90 min、120 min 进行取样检测，以此来观察 2～8℃条件下β-丙内酯在不同体系下的降解情况。

2　结果

2.1　乙腈最佳添加量确定

以乙腈稀释的 BPL 纯品为对照，对比了不同乙腈比例处理下的 BPL 水溶性样品的加标回收率（稀释比例分别为：1:1、1:10、1:20、1:40、1:80）。结果表

明，随着乙腈含量的不断增加，BPL 的回收率呈现先增后降的变化趋势。当 PBS:乙腈=1:20 时，回收率为 98.2%，当 PBS:乙腈=1:40 时达到最大值，回收率为 113.9%（高于 100%）。所以最终选择 PBS:乙腈=1:20 为最优稀释配比，所得结果见图 2。

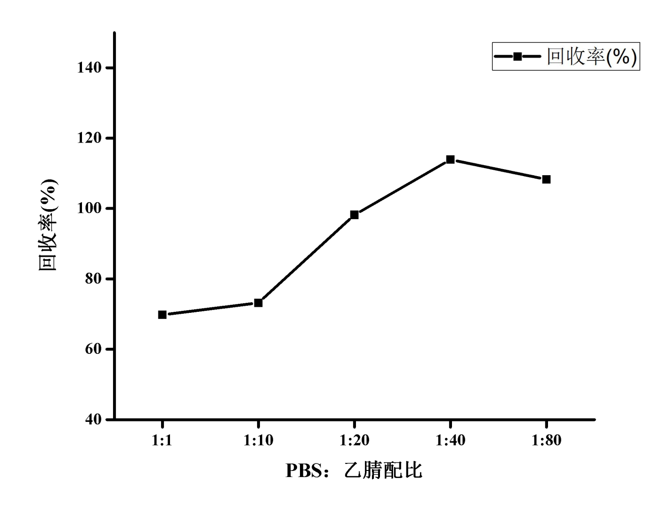


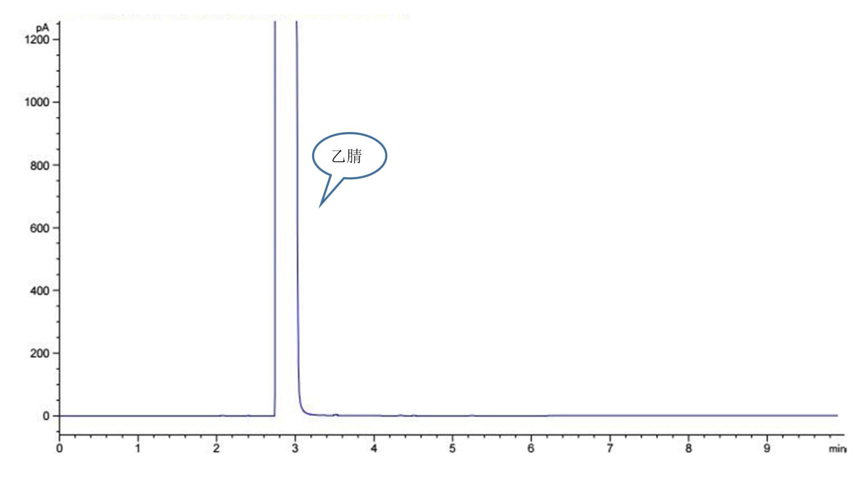
图 2　不同乙腈比例下的 BPL 回收率

Figure 2　BPL recovery rates at different acetonitrile ratios

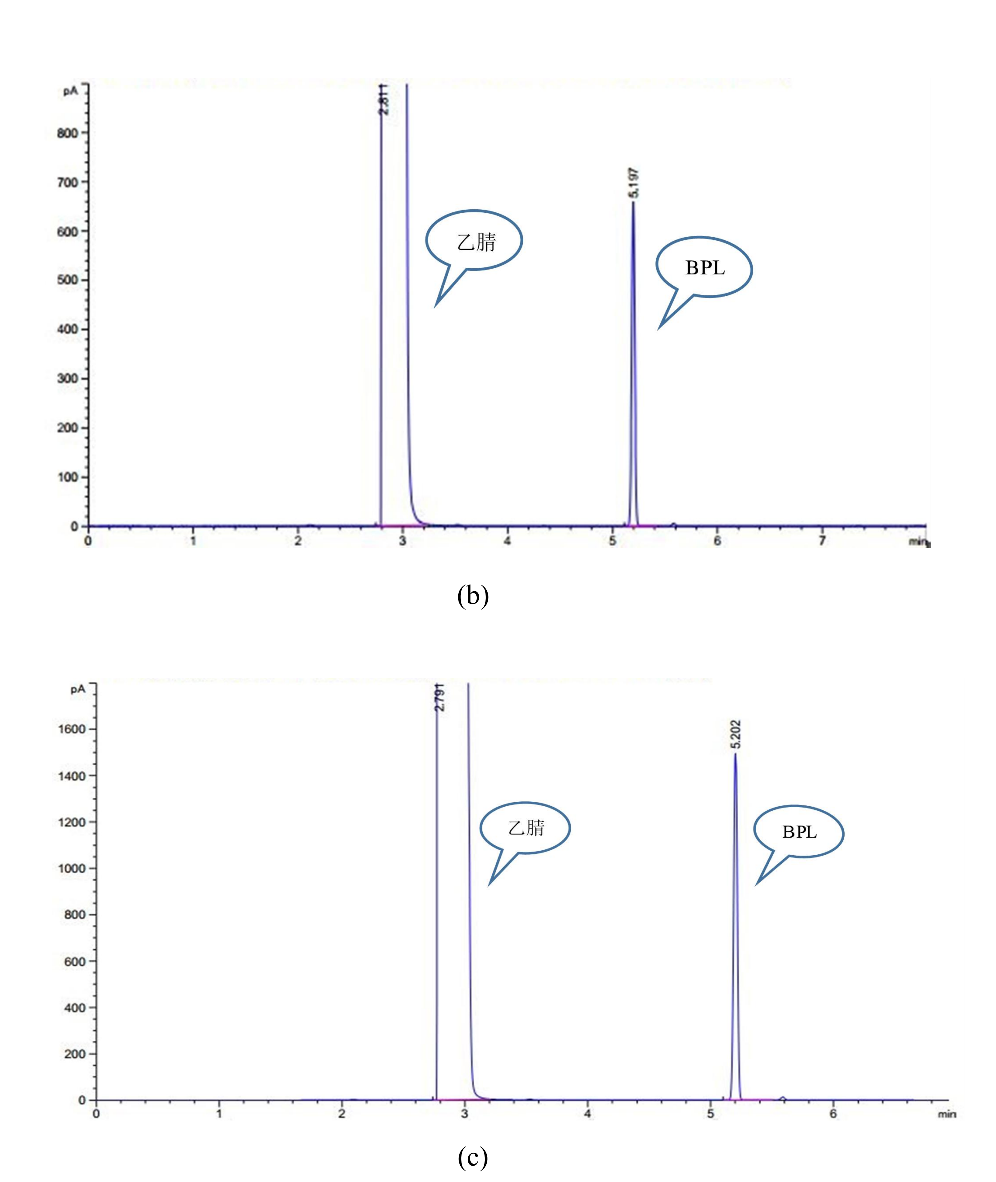
2.2　方法学验证结果

2.2.1　专属性

在 1.3 所示的色谱条件下，分别对溶液 a、b、c 进行上机检测，所得色谱图见图 3。图中显示乙腈和 BPL 的保留时间分别为 2.811min、5.197 min，这与样品中二者的出峰时间保持很好的一致性，且分离度大于 1. 5，满足了本实验的色谱分离要求。



(a)



(b)

(c)

图 3　各溶液对应的气相色谱图

（a）空白乙腈溶液　（b）1:2000 BPL-乙腈标准溶液　（c）已知 BPL 浓度的样品溶液

Figure 3　Gas chromatogram

(a) Blank acetonitrile　(b) 1:2000 BPL-acetonitrile standard solution　(c) Sample solution with known BPL concentration

2.2.2　线性关系、检出限和定量限

以 BPL 峰面积（A）为纵坐标，质量浓度（C，mg/mL）为横坐标绘制的标准工作曲线见图 4 所示。BPL 在 0.035～11.23 mg/mL 的浓度范围内呈现良好的线性关系，R^2=0.9991。以信噪比为 3:1 确定 BPL 的检测限为 0.112 μg/mL，信噪比为 10:1 确定 BPL 的定量限为 0.550 μg/mL。

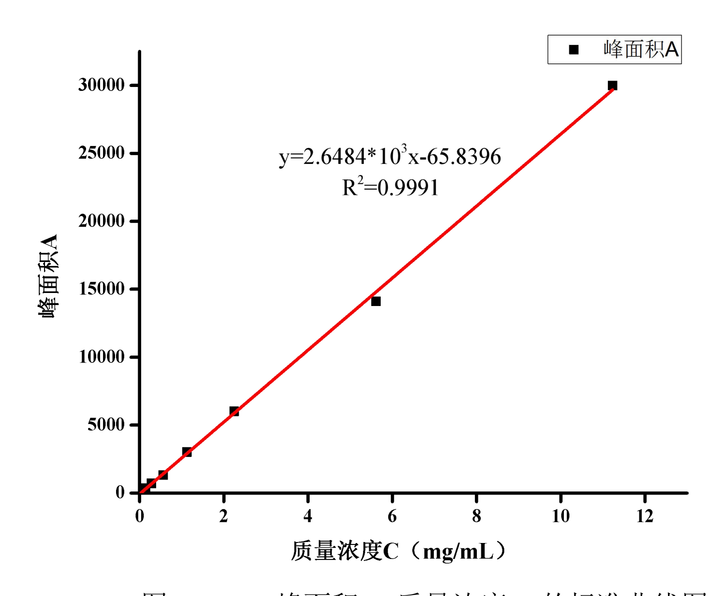


图 4　BPL 峰面积 A-质量浓度 C 的标准曲线图

Figure 4　Standard curve of BPL (peak area A-mass concentration C)

2.2.3　准确度

以已知 BPL 浓度的样品为研究对象，在 1:200、1:1000、1:8000 三个不同浓度水平下进行加标回收实验（n=3），结果见表 1。从表中可知 BPL 在三个不同浓度水平下的加标回收率在 95.04%～116.86%之间，相对标准偏差（RSD）为 2.6%～3.2%，说明了该方法准确度高，可满足相关标准和法规的定量检测要求。

表 1　BPL 在不同浓度梯度下的加标回收率

Table 1　spiked recovery of BPL under different concentration gradients

浓度梯度	回收率（%）	RSD（%）
1:200（高）	116.86	2.8
1:1000（中）	102.57	2.6
1:8000（低）	95.04	3.2

2.2.4　精密度

在 1.3 所示的色谱条件下，取 1:2000 的 BPL 标准溶液重复进样 6 次（n=6），得出此条件下 BPL 保留时间的 RSD 为 0.032% ，峰面积 RSD 为 2.93%，说明了该方法精密度良好。详细结果见表 2。

表 2 气相色谱法检测 BPL 精密度结果分析表

Table 2 Analysis of BPL precision by gas chromatography

进样次数	保留时间	峰面积
1	5.194	1366.4
2	5.192	1392.5
3	5.193	1384.0
4	5.190	1404.8
5	5.191	1463.3
6	5.194	1343.4
RSD（%）	0.032	2.93

2.2.5 耐用性

由图 5 可知，室温条件下，BPL 在乙腈溶液中（1:4000）6 h 内能够稳定存在，RSD 为 1.07%。

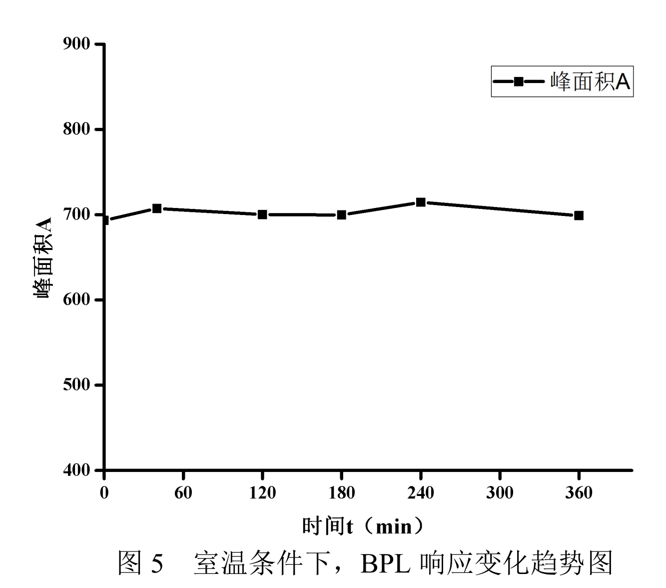


图 5 室温条件下，BPL 响应变化趋势图

Figure 5 Response trend of BPL at room temperature

2.3 2～8℃时，不同体系下 BPL 降解速度考察结果

以乙腈处理 BPL 纯品（BPL:乙腈=1:2000）和 BPL 水溶性样品（PBS:乙腈=1:20），分别研究了 2～8℃环境下，BPL 在不同体系下在 0 min、15 min、30 min、60 min、90 min、120 min 的变化情况。结果发现在 2 h 内 BPL 纯品的响应总趋势虽有所降低，但变化缓慢，所以在短期处理时间内 BPL 能够保持所需的灭活水平。与之相似，BPL 在 PBS 缓冲液中的响应也下降较缓，这可能是因为 BPL

的水解反应速率与 pH 值密切相关[17]。

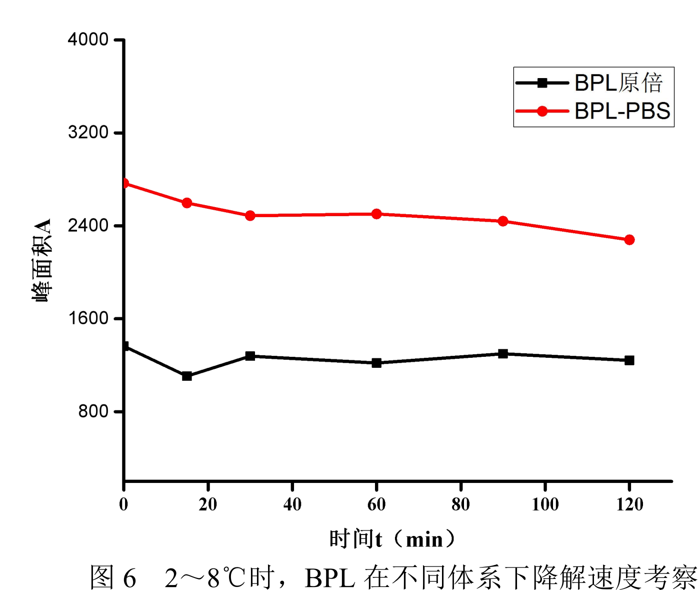


图 6　2～8℃时，BPL 在不同体系下降解速度考察

Figure 6　Degradation rate of BPL under different systems at 2-8 ℃

3　讨论

BPL 作为一种理想灭活剂，不仅效率高，而且水解后形成对人体无害的β-羟基丙酸，所以目前在各种病毒疫苗的灭活工艺中得到广泛应用。截止目前，针对 BPL 的方法检测和应用也出现了诸多文献报道[18-21]，然而却未对分析方法的准确度进行讨论。除此之外，虽有研究指明[22,23]按 1:4000 比例加入 BPL 在 30 min 内即可将人用狂犬病病毒完全灭活，但倘若灭活前滞留时间过长，因自身聚合和水解反应，就会造成 BPL 实际作用的浓度低于添加值，最终导致在相同的灭活时间内，灭活不完全。故模拟生产工艺中 BPL 的使用操作，观察其过程中的变化趋势对灭活狂犬病病毒十分重要，而对该方面的研究也鲜见说明。

本文利用气相色谱法，采用乙腈作为稀释剂建立了人用狂犬疫苗中 BPL 含量测定方法，并确定了 PBS:乙腈=1:20 的稀释配比来提高方法的准确度。通过对该方法进行方法学验证得出，该方法具有专属性强、灵敏度高、准确度和精密度好、检出限低等优点。此外，该方法在室温条件下操作，大大降低了对试验条件和技术操作的要求，可满足灭活狂犬病病毒工艺中对 BPL 检测的需求。通过模拟病毒工艺中 BPL 的使用操作，研究了 BPL 添加到病毒中间体之前的变化趋势，也为确定 BPL 在病毒灭活工艺中适宜的工作浓度及添加时限提供了数据参考。

参考文献

[1] 谭寿南, 张凤羽. 狂犬病及人用狂犬病疫苗研究. 临床医学, 2011, 24(5): 2841-2843.
Tan S N, Zhang F Y. Rabies and human rabies vaccine research. Clinical Medicine, 2011, 24(5): 2841-2843.

[2] 李义. 狂犬病的诊断与防治研究. 上海畜牧兽医通讯, 2018, (4): 56-57.
Li Y. Diagnosis and prevention of rabies. Shanghai Livestock and Veterinary Communication, 2018, (4): 56-57.

[3] 蔡黎, 朱政纲, 文丽, 等. 人用狂犬病疫苗研究进展. 药物流行病学杂志, 2017, 26(12): 841-844.
Cai L, Zhu Z G, Wen L, et al. Progress in research on human rabies vaccine. Chinese Journal of Pharmacoepidemiology, 2017, 26(12): 841-844.

[4] 王春雨, 徐琳凯, 李超, 等. 工艺处理过程中病毒的灭活效果研究. 实验动物科学, 2015, 32(2):15-17.
Wang C Y, Xu L K, Li C, et al. Study on the inactivation effect of virus during process. Laboratory Animal Science, 2015, 32(2):15-17.

[5] 国家药品监督管理局. 生物制品生产工艺过程变更管理技术指导原则. [2018-09-15]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0844/9350.html.
State Drug Administration. Biological product production process change management technology guiding principles. [2018-09-15]. http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0844/9350.html.

[6] 宋清爽, 吴恩应, 张运佳, 等. 血液制品病毒灭活及去除工艺进展. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 627-630.
Song Q S, Wu E Y, Zhang Y J, et al. Advance in virus inactivation and removal processes of blood products. Letters In Biotechnology, 2012, 23(4): 627-630.

[7] She Y M, Cheng K D , Aaron Farnsworth, et al. Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β-propiolactone. Proteomics, 2013, 13: 3537-3547.

[8] Sasaki Y, Yoshino N, Sato S, et al. Analysis of the beta-propiolactone sensitivity and optimization of inactivation methods for human influenza H3N2 virus. Journal of Virological Methods, 2016, 235: 105-111.

[9] Chen W, Li Z, Liu J, et al. Application of β-propiolactone in HFRS vaccine. Chinese Journal of Public Health, 2003, 19: 669-670.

[10] Zhang Y, Gao C, Pan G, et al. Determination of β-propiolactone residues in human rabies vaccine for Vero cells. Chinese Journal of Biologicals, 1998, 11: 144.

[11] 杨健, 高军, 张庆义, 等. β-丙内酯含量气相色谱检测方法的建立及其水解情况分析. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(3): 323-324.
Yang J, Gao J, Zhang Q Y, et al. Development of Gas Chromatography for Determination of Propiolactone（BPL）Content and Analysis of BPL Hydrolysis. Chinese Journal of Biologicals, 2010, 23(3): 323-324.

[12] 梁婧, 李举, 马继华, 等. 气相色谱法检测灭活狂犬病病毒浓缩液中β-丙内酯的含量. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(12): 1317-1320.
Liang J, Li J, Ma J H, et al. Determination of β-propiolactone content in inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography. Chinese Journal of Biologicals, 2017, 30(12): 1317-1320.

[13] Shan G, Ma X, Ji H, et al. Determination of residual β-propiolactone in inactivated rabies virus concentrate by gas chromatography. China Pharmacy, 2014, 25: 2357-2359.
[14] Xu Y, Wei R, Jiang Y, et al. Study on the determination of β-propiolactone in rotavirus vaccine by gas chromatography. Progress in Microbiology and Immunology, 2010, 38: 21-23.
[15] Lei S, Gao X, Sun Y, et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β-propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2018, 06(003).
[16] 山广志，马迅，纪宏，等．气相色谱法检测灭活狂犬病毒浓缩液中残留的β-丙内酯．中国药房, 2014, 25(25): 2357-2359.
Shan G Z, Ma X, Ji H, et al. Determination of Residual β-propiolactone in Inactivated Rabies Virus Concentrate by Gas Chromatography. China Pharmacy, 2014, 25(25): 2357-2359.
[17] 李福安，窦志勇，潘丽静．狂犬疫苗灭活后β-丙内酯水解的最佳 pH 值的选择．中国公共卫生, 1999, 15(11): 964.
Li F A, Dou Z Y, Pan L J. Selection of optimal pH for hydrolysis of β-propiolactone after rabies vaccine inactivation. Chinese Journal of Public Health Management, 1999, 15(11): 964.
[18] 徐守振，王新，尹燕博．四种不同灭活剂对新城疫病毒的灭活效果研究．中国家禽, 2011, 33(14): 15-19.
Xu S Z, Wang X, Yin Y B. Inactivation Efficacy of Newcastle Disease Virus with Four Different Inactivants. China Poultry, 2011, 33(14): 15-19.
[19] Delrue I, Verzele D, Madder A, et al. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. Expert Rev Vaccines, 2012, 11(6): 695-719.
[20] 龚文波，郝伟伟，廖韦萍，等．两种不同灭活剂对基因Ⅶ型新城疫病毒灭活效果的影响研究．四川畜牧兽医, 2017, 10: 21-23.
Gong W B, Hao W W, Liao W P, et al. Inactivation Effect of Genotype Ⅶ Newcastle Disease Virus with Two Different Inactivants. Sichuan Animal and Veterinary Sciences, 2017, 10: 21-23.
[21] 冯若飞，樊得英，韦鹏建，等. β-丙内酯对脑心肌炎病毒灭活效果的试验．中国兽医杂志, 2011, 47(8): 19-21.
Feng R F, Fan D Y, Wei P J, et al. Experiment on the inactivation effect of β-propiolactone on encephalomyocarditis virus. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2011, 47(8): 19-21.
[22] 姜立民，林晓波，高磊，等. β-丙内酯对狂犬病病毒的灭活效果．国际流行病学传染病学杂志, 2014, 41(2): 137-139.
Jing L M, Lin X B, Gao L, et al. Inactivation of rabies virus with β-propiolactone. Journal of the Chinese Medical Association, 2014, 41(2): 137-139.
[23] 国家药典委员会．中国药典．第三部．北京：中国医药科技出版社, 2015: 146-149.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia. Third part. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 146-149.

Study on β-propiolactone in Inactivation Process of Rabies Vaccine by Gas Chromatography

GAO Yan DU Jing-jing WANG Bin LIU Qi SHEN Zhi-qiang*

(Hualan Biological Engineering, INC R&D Center Xinxiang 453000, China)

Abstract Objective: According to GC-FID method, this work systematically studied the content and stability of β-propiolactone which was used as an inactivator in the preparation of rabies vaccines. Methods: Gas chromatography condition: Agilent DB-624 (30 m×0.530 mm×3.00 μm) capillary column was adopted. The temperature program: Initial temperature of 80 °C was maintained for 1 min, then was raised to 200 °C at the rate of 20 °C/min and was maintained for 3 min. Column flow: 3 mL/min. The temperatures of detector and inlet were 250 °C and 150 °C respectively. The linear velocity of the carrier gas (nitrogen) was set to 25 cm/sec. The injection volume was 1 μL and the split ratio was 2:1. The sampling mode: Manual injection. Results: BPL showed good linear relationship in the range of 1:100～1:32000 with a correlation coefficient more than 0.999. A recovery study of BPL at three different concentration (1:200, 1:1000, 1:8000) of spiked samples with range from 95 % to 116.9 % with RSD less than 3.2 % further demonstrated the reliability and feasibility of this method. Moreover, the LOD of established method can be achieved as low as 0.112 μg/mL. Conclusion: The method is simple, specific, stable and can be carried out at room temperature with a satisfactory result, which reduces the requirements of complicated operation. In a word, the proposed method can meet the need that determines BPL in the process of inactivating rabies virus.

Key words Rabies vaccine β-propiolactone(BPL) Gas chromatography